

Osteocalcin: posttranslational gamma carboxylation of a unique vitamin K-dependent protein

Citation for published version (APA):

Houben, R. J. T. J. (1999). *Osteocalcin: posttranslational gamma carboxylation of a unique vitamin K-dependent protein*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19991216rh>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19991216rh](https://doi.org/10.26481/dis.19991216rh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

Summary, conclusions and discussion

Chapter 1

During synthesis *in vivo*, proteins undergo extensive post-translational processing before being able to function appropriately. Some of these modified proteins are secretory proteins such as the Gla-proteins involved in blood coagulation or tissue-mineralization processes. Carboxylation of specific glutamate (Glu) residues into γ -carboxy glutamate (Gla) residues is one of the postranslational processes and is accomplished by the vitamin K-dependent enzyme γ -glutamyl carboxylase. Vitamin K-hydroquinone (KH_2) is the cofactor and an absolute requirement in the carboxylation process. During the conversion of Glu into Gla, KH_2 is oxidized to vitamin K 2,3 epoxide (KO) in a 1:1 stoichiometry via an intermediate vitamin K alkoxide. Subsequently, KO is reduced in two steps; first to K by the enzyme KO-reductase and then to KH_2 by the enzyme K-reductase. Due to this "recycling" mechanism, the daily requirement in humans for vitamin K is relatively low. The conversion of Glu to Gla is necessary for the calcium-binding properties of the Gla-proteins. Only a small number of all the known proteins in man are Gla-proteins. Therefore the Gla-proteins have to be distinguishable from other proteins so they can be recognized by the vitamin K-dependent carboxylase. For that aim, the precursor forms of the Gla-proteins possess a domain, a so-called propeptide, which makes them capable of binding to carboxylase with high affinity. The goal of this thesis was to gain insight in the determinants responsible for the recognition of the Gla-precursor molecule and carboxylase. For that purpose we have chosen to use substrates derived from the bone Gla-protein osteocalcin, from the precursor protein of human coagulation factor IX, and from the precursor protein of human prothrombin. In this chapter a review on the literature is presented concerning the history and current status of our knowledge regarding carboxylase, its cofactors and substrates. Moreover the function of the various Gla-proteins is discussed.

Chapter 2

The bone Gla-protein osteocalcin is unique in its ability to bind carboxylase with high

affinity. To obtain sufficient amounts of this bone protein, several strategies can be applied. The first method is to purify the native protein from (bovine/human) bone. However, this technique has several disadvantages; (i) it is laborious with relatively low yields and in case of isolation from human bones (ii) the source is limited and there is a potential risk of infection. Besides these drawbacks, the protein obtained from bone is carboxylated and thus not useful as an *in vitro* substrate for carboxylase. Thermal decarboxylation of native osteocalcin can be applied but may induce unwanted and unpredictable damage to the protein due to the reaction conditions of the procedure. As a second possibility, recombinant DNA techniques can be utilized to produce unlimited amounts of osteocalcin in bacteria (*Escherichia coli*). The osteocalcin produced in *E.coli* is not carboxylated and can be used as a substrate for carboxylase. Besides the synthesis in *E.coli*, chemical synthesis is a third possibility to obtain both carboxylated- (OC) and descarboxy-osteocalcin (d-OC) of high purity. Nevertheless, this technique has its limitations, and the length of the OC molecule (49 amino acids) is approximately the maximum which can be routinely synthesized. In this thesis we have chosen to study the substrate properties of osteocalcin using both organically synthesized OC and d-OC. Once the proper protocol has been selected to produce sufficient amounts of d-OC, carboxylase from various tissue types can be used to study the properties of d-OC and other substrates. Furthermore the isolation of carboxylase in the form of washed microsomes from various types of tissue, and its use in enzyme substrate interactions is described here.

Chapter 3

One of the high affinity substrates used in carboxylase research is ProIX-59 Q/S. ProIX-59 Q/S consists of the propeptide covalently attached to the descarboxy Gla-domain of factor IX, and functions as a good substrate for carboxylase. The interactions of the propeptide and the Gla-domain is studied using purified bovine carboxylase. The importance of the propeptide for the carboxylation of the glutamate residues in the factor IX Gla-domain, the effect of the propeptide on the carboxylation of a non-Gla-domain sequence containing 5 Glu residues, and the substrate properties of synthetic

d-OC for purified bovine carboxylase is described in this chapter. From the results reported in this chapter we can draw several conclusions: (i) the affinity of the carboxylase substrate and processivity is induced by the propeptide without requiring the conserved Gla-domain sequences and (ii) factor IX and osteocalcin may have distinct mechanisms of interaction with the carboxylase.

Chapter 4

Since the results described in chapter 3 were obtained using purified carboxylase from bovine liver containing at least 2 μM propeptide a new protocol for the production of carboxylase was developed. For this aim we have collaborated with the group of Prof. Dr. Stafford (Department of Biology, The University of North Carolina at Chapel Hill, U.S.A), who cloned the cDNA sequence of human γ -glutamyl carboxylase and expressed it in an insect cell line, normally free of carboxylase. The carboxylase purified from these cells was completely free of any interfering propeptide or propeptide containing substrates (endogenous substrate). Therefore the purified recombinant human carboxylase is the system of choice to study enzyme / substrate interactions where the absence of a propeptide is required (e.g. d-OC).

Although the unique properties of d-OC already have been discussed in chapters 2 and 3, its characteristics are studied more extensively in this chapter. Chapter 4 describes the absence of inhibition by free propeptide of factor IX (Pro^{FIX}) on d-OC, whereas Pro^{FIX} strongly inhibits ProIX-59 Q/S carboxylation. Furthermore d-OC carboxylation is not stimulated by Pro^{FIX} in contrast to bEELoMe. Pro^{FIX} lowers the K_m of short pentapeptide substrates 10 fold. The propeptide of osteocalcin (Pro^{OC}) was incapable of either inhibiting ProIX-59 Q/S and d-OC carboxylation. Moreover Pro^{OC} could not stimulate bEELoMe carboxylation, nor could it lower the K_m of bEELoMe. Synthetic carboxylated osteocalcin (OC) inhibited both d-OC and bEELoMe, whereas it was incapable of inhibiting ProIX-59 Q/S carboxylation. These results implicate that Pro^{OC} does not contribute to the high affinity carboxylase binding of the osteocalcin precursor molecule and that d-OC binds carboxylase at a site distinct from the propeptide binding site. However, it remains unclear whether d-OC binds to the active site, or on a distinct

osteocalcin binding site on carboxylase.

Chapter 5

In this chapter definite proof is given that d-OC binds carboxylase with high affinity on a specific d-OC binding domain. By using a stereospecific active site inhibitor (S -MeTPT) for carboxylase we have shown that bEELOMe is competitively inhibited by S -MeTPT. ProlX-59 Q/S is competitively inhibited by Pro^{FIX}, since ProlX-59 Q/S initially binds the propeptide binding site on carboxylase prior to its carboxylation. Addition of S -MeTPT to ProlX-59 Q/S carboxylation resulted in a non-competitive inhibition of ProlX-59 Q/S. This is in agreement with the proposed mechanism by which ProlX-59 Q/S interacts with carboxylase. Since d-OC is inhibited by neither Pro^{FIX} nor Pro^{OC} it was expected that d-OC would bind the active site on carboxylase and therefore competitively inhibited by S -MeTPT. However, addition of S -MeTPT to d-OC carboxylation resulted in a non-competitive inhibition of d-OC. Since d-OC lacks a propeptide these results give rise to postulate that carboxylase possesses a specific d-OC binding domain, where d-OC can bind with high affinity in a propeptide independent way.

Chapter 6

Here we describe the domain by which d-OC is capable of binding with high affinity to carboxylase. From other Gla-proteins it is known that the precursor proteins contain a high affinity propeptide at the N-terminus, immediately adjacent to the Gla domain. Matrix Gla protein (MGP) is the only known Gla-protein to contain an internal propeptide which is homologous to the propeptide, but which is not removed from the protein after carboxylation. In the N-terminus of the d-OC molecule no homology can be found with the propeptide of either the other known Gla-proteins, or MGP. Nevertheless, we expected the high affinity carboxylase recognition sequence (CRS) of d-OC to be located N-terminally adjacent to the Gla-domain, between residues 1 and 16. The Gla-domain consists of residues 17 to 24. We therefore generated various d-OC peptides, d-OC¹⁻²⁵, d-OC³⁻²⁵, d-OC⁵⁻²⁵, d-OC⁷⁻²⁵, d-OC¹⁰⁻²⁵, and d-OC¹³⁻²⁵, all containing the

non carboxylated Gla-domain, which may serve as a substrate in the *in vitro* carboxylase assay. The kinetic parameters of these peptides were compared with the intact d-OC molecule. Due to the different N-terminal deletions it became evident that indeed substantial CRS activity is located between residues 1 and 13. Some of the residues proved to be particularly important, since deletion resulted in dramatic increases in the K_m of the peptides. However, the K_m of the d-OC¹⁻²⁵ still differed 10-fold when compared to the intact d-OC molecule. The efficiency of carboxylation was the highest for d-OC¹⁻⁴⁹, GST-rhOC¹⁻⁴⁹ and GST-rhOC¹⁻³⁹ when compared to the short d-OC peptides, the propeptide-containing substrates or the short tri- and pentapeptides. Furthermore, a secondary structural component, located between residues 26 and 39 of the d-OC molecule is also involved in the high affinity binding of osteocalcin to carboxylase, since this domain is capable of lowering the K_m of d-OC 10-fold and increasing the efficiency of carboxylation ~12-fold.

Summarizing, the major findings presented in this thesis are (I) that the vitamin K-dependent carboxylase, besides the active site, possesses at least two substrate recognition domains. One recognition site is available for the "coagulation factor-type" Gla-proteins, the other site is essential for "OC-type" substrates. The first site recognizes propeptides, the latter recognizes a sequence present on OC which has not been defined previously.

(II) Closer analysis of the sequence composition revealed that the carboxylase recognition sequence on d-OC is composed of two units. The first unit consists of residues 1-13 (N-terminal of the Gla-domain), and the second unit is composed of residues 26-39 (C-terminal of the Gla-domain). The fact that a carboxylase recognition site exists which is composed of two segments, divided by a Gla-domain, is new.

(III) The efficiency of d-OC carboxylation is the highest when compared to propeptide-containing substrates and short pentapeptides.

(IV) *In vivo*, the precursor molecule of osteocalcin is synthesized containing a propeptide. Nonetheless, this propeptide has no measurable affinity for carboxylase. Therefore, the function of the osteocalcin propeptide remains unclear. It is possible that

the osteocalcin propeptide is required for a more efficient utilization of KH_2 , by lowering its K_m .

Discussion

Recombinant synthesis of descarboxy osteocalcin in *E. coli*, either with or without an attached propeptide has turned out to be more difficult than was expected. A single explanation for the low expression levels we obtained cannot be given. What remains is that only very few groups in the world have succeeded in producing low amounts of bacterially synthesized osteocalcin. The fact that bovine decarboxylated osteocalcin (bd-OC) already displayed unique substrate properties was one of the main reasons to start our line of investigations. Our experimental data from organically synthesized human descarboxy osteocalcin (d-OC) have confirmed and founded the previous results; osteocalcin possesses unique properties as a substrate for carboxylase. Our experimental data have substantiated the previous results obtained with bd-OC in washed microsomes, the interpretation of which was difficult due to the fact both the substrate and the enzyme were from bovine origin and the properties could therefore be distinct from the human proteins. Besides that, the possible damaging of bd-OC by thermal decarboxylation could not be assessed. In the experiments described in this thesis we have used purified human recombinant carboxylase (chapters 4, 5 and 6) as a source for carboxylase, free of contaminating and interfering propeptides or endogenous substrates, which makes our experimental results more convincing. The results presented in this thesis have added new insights to the mechanism by which Gla proteins are able to bind carboxylase. What previously was unknown was that carboxylase has at least two high affinity binding sites for the Gla precursor proteins. Whether these two binding sites are the only ones present on carboxylase remains to be awaited, but might have considerable consequences for optimal synthesis of, for instance, recombinant Gla proteins in human eukaryotic cell lines, necessary for the treatment of hemophilia. However, a proper understanding of the structure and interactions between the Gla precursor proteins and carboxylase is required to obtain maximal efficient production and carboxylation.

The recent discovery of new Gla-proteins like the carboxylase itself, or proteins that are not involved in blood coagulation but in cellular growth (Gas-6), and other yet unknown processes (the putative PRGP 1 and PRGP 2) indicates that the discovery of other new Gla-proteins is likely ^{1,2}. The type of interaction between the yet undiscovered Gla-proteins interact with carboxylase might be, like osteocalcin, in a propeptide independent way. This can be illustrated using a hypothetical calculation; It is expected that the human genome contains 100.000 genes. From these genes, 30% is known, which results in 30.000 proteins that have been currently discovered. If the known 13 Gla-proteins represent 30% of the total amount of Gla-proteins, this means that there are still 30 Gla-proteins to be discovered. Of these 30 Gla-proteins, at least 2 proteins will bind carboxylase in a propeptide independent way. Maybe, this could indicate that carboxylase is a much more versatile enzyme as was expected, capable of binding various types of proteins.

The role of Gla as a Ca^{2+} (or other divalent metal-ions) binding residue remains to be discussed. A large number of other proteins are very well capable of binding Ca^{2+} without the need for Gla. Osteonectin, a non-Gla basement membrane protein found in bone and platelets contains a glutamic acid-rich Ca^{2+} binding domain. Gas-6 for instance, functions as a ligand for different protein kinases which are involved in cellular growth regulation. A deletion mutant of Gas-6, lacking the Gla domain, is very well capable of binding to the extracellular domains of two cell adhesion molecule-related tyrosine kinase receptors, Rse and Axl, and thereby activating phosphorylation³. Therefore the question remains what is the the function of the Gla residues within Gas-6 or other (yet unknown) Gla-proteins. The vitamin K-dependent carboxylase itself is also a Gla-protein, which possesses 3 Gla residues ⁴. The function and the location of these Gla residues is still unknown. Furthermore it is unclear whether carboxylase is capable of functioning without being carboxylated itself. Gla residues also have been discovered already in 1982 in hermatypic corals, but the origin of the Gla remained unclear ⁵. Gla-proteins have also been discovered in the venom duct of the predatory marine snail, *Conus geographus* ⁶. This was the first invertebrate organism reported to possess the posttranslational carboxylation mechanism, which was thought to be

restricted to rather specialized mammalian systems. The invertebrate Gla-protein, called conantokin-G, is a 17 amino acid peptide that inhibits the *N*-methyl-D-aspartate receptor, thereby paralyzing the fish and thus become prey for the fish-hunting snail. Besides conantokin-G there are at least two other conantokins that contain Gla-residues, namely conantokin-T and conantokin-R^{7,8}. The conantokin precursor proteins contain a propeptide which binds *Conus* carboxylase with high affinity, but not the mammalian enzyme. This implies a difference in either the enzyme or the propeptide of the conantokin precursor proteins versus the mammalian propeptides. Whether d-OC is able to bind *Conus* carboxylase remains to be investigated, but this is very well possible, and might thus form additional evidence for human descent and evolution.

The importance of the newly discovered carboxylase recognition sequence is that it offers a possibility for substrates to be carboxylated at a significant distance from the N-terminus. Normally, in propeptide-containing substrates, carboxylation takes place within the first 40 N-terminal amino acids. The chimeric osteocalcin molecules synthesized by Käkönen et al. (chapter 6, this thesis) showed that OC-type recognition can occur at any position within a larger protein. Using this knowledge it may be possible to search for new members of this class of Gla-proteins.

The results presented in this thesis will add to the understanding of the characteristics required in the mechanism of the high affinity association between the various Gla-precursor proteins, osteocalcin in particular, and the vitamin K-dependent γ -glutamyl carboxylase.

References

1. Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* **13**, 4976-4985 (1993).
2. Kulman, J. D., Harris, J. E., Haldeman, B. A. & Davie, E. W. Primary structure and tissue distribution of two novel proline rich gamma carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9058-9062 (1997).
3. Mark, M. R., Chen, J., Hammonds, R. G., Sadick, M. & Godowsk, P. J. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain- containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* **271**, 9785-9789 (1996).
4. Berkner, K. L. & Pudota, B. N. Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci*

USA 95, 466-471 (1998).

5. Hamilton, S. E. *et al.* gamma-Carboxyglutamic acid in invertebrates: its identification in hermatypic corals. *Biochem Biophys Res Commun* **108**, 610-613 (1982).
6. McIntosh, J. M., Olivera, B. M., Cruz, L. J. & Gray, W. R. Gamma-carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J Biol Chem* **259**, 14343-14346 (1984).
7. Haack, J. A. *et al.* Conantokin-T. A gamma-carboxyglutamate containing peptide with N-methyl- d-aspartate antagonist activity. *J Biol Chem* **265**, 6025-6029 (1990).
8. White, H. S. *et al.* Conantokin-R. *Soc Neurosci Abstr* **23**, 2164 (1997).

Samenvatting, conclusies en discussie

Hoodstuk 1

Tijdens de *in vivo* synthese van eiwitten ondergaan deze een groot aantal post-translationele modificaties alvorens ze hun functie goed kunnen uitoefenen. Deze bewerkte eiwitten zijn secretair, zoals de Gla-eiwitten welke betrokken zijn bij bloedstollings- of weefselmineralisatie processen. De carboxylering van specifieke glutaminezuur (Glu) residuen tot γ -carboxy glutaminezuur (Gla) is een van de post-translationele modificaties die wordt uitgevoerd door het vitamine K-afhankelijke enzym γ -glutamyl carboxylase. Dit carboxyleringsproces is alleen mogelijk in de aanwezigheid van de cofactor vitamine K hydroquinon (KH_2). Tijdens de omzetting van Glu naar Gla wordt KH_2 in een 1:1 verhouding geoxideerd tot vitamine K 2,3 epoxide (KO) via een intermediair vitamine K alkoxide. KO wordt vervolgens in twee opeenvolgende stappen gereduceerd; eerst tot K door het enzym KO-reductase en vervolgens tot KH_2 door het enzym K-reductase. Als gevolg van dit "recycling" proces is de humane dagelijkse behoefte aan vitamine K relatief gezien erg laag. De omzetting van Glu naar Gla is nodig voor de calcium-bindende eigenschappen van de Gla-eiwitten. Slechts een beperkt aantal van alle bekende eiwitten in de mens zijn Gla-eiwitten. Daarom is het noodzakelijk dat deze Gla-eiwitten zich onderscheiden van andere eiwitten zodat ze herkenbaar zijn voor het vitamine K-afhankelijke carboxylase. Derhalve bezitten de voorloper vormen van de Gla-eiwitten een domein, het zogenaamde propeptide, dat hen in staat stelt met een hoge affiniteit te binden aan het carboxylase. Het doel van dit proefschrift was het verschaffen van inzicht in de determinanten die noodzakelijk zijn voor de herkenning van de Gla-voorloper eiwitten door het carboxylase. Daarvoor is er besloten gebruik te maken van substraten afgeleid van het bot Gla-eiwit osteocalcine, van het voorlopereiwit van de humane bloedstollingsfactor IX, en van het voorlopereiwit van humaan prothrombine. In dit hoofdstuk wordt een literatuuroverzicht gegeven van de ontdekking van vitamine K in 1935 tot het huidige kennisniveau en inzichten over het carboxylase, de cofactoren en substraten. Tevens worden de functies van de verschillende humane Gla-eiwitten besproken.

Hoofdstuk 2

Het bot Gla-eiwit osteocalcine bezit een aantal unieke eigenschappen waardoor het in staat is om met een hoge affiniteit aan carboxylase te binden. Om voldoende van het osteocalcine te verkrijgen kunnen er verschillende methodes worden toegepast. De eerste mogelijkheid is om het natieve eiwit op te zuiveren uit (bovine/humane) botten. Aan deze techniek kleven echter een aantal nadelen; (i) het is een arbeidsintensieve methode met een lage opbrengst en in het geval van isolatie uit humane botten (ii) is de bron gelimiteerd en bestaat er een aanzienlijk infectierisico. Bovendien is het osteocalcine dat op deze wijze wordt gezuiverd reeds gecarboxyleerd, waardoor het niet bruikbaar is als *in vitro* substraat voor carboxylase. Thermische decarboxylering van natief osteocalcine kan worden toegepast maar zou ongewenste en onvoorspelbare schade kunnen induceren in het eiwit als gevolg van de reactieomstandigheden. Recombinant DNA technieken kunnen worden toegepast om ongelimiteerde hoeveelheden osteocalcine te produceren in bacteriën (*Escherichia coli*). Het door *E. coli* geproduceerde osteocalcine is niet gecarboxyleerd en kan daardoor worden gebruikt als *in vitro* substraat voor carboxylase. Naast de synthese van osteocalcine door *E. coli* is het ook mogelijk om zowel gecarboxyleerd osteocalcine (OC) als descaboxy-osteocalcine (d-OC) in zuivere vorm te verkrijgen met behulp van chemische synthese. Niettemin heeft ook deze techniek zijn beperkingen en de lengte van het OC molecuul (49 aminozuren) is ongeveer de maximum lengte die routinematig kan worden gesynthetiseerd. In dit proefschrift is ervoor gekozen om de substraateigenschappen van osteocalcine te bestuderen aan de hand van zowel organisch gesynthetiseerd OC als d-OC. Indien het juiste protocol is gekozen om voldoende hoeveelheden d-OC te genereren, kan er carboxylase worden gebruikt dat afkomstig is uit verschillende weefseltypen, om zo de eigenschappen van d-OC en andere substraten te bestuderen. Bovendien wordt de isolatie van het carboxylase uit verschillende weefseltypen in de vorm van gewassen microsomen en het gebruik hiervan bij enzym/substraat interacties in dit hoofdstuk beschreven.

Hoofdstuk 3

Een van de substraten die wordt gebruikt in het carboxylase onderzoek is ProIX-59 Q/S. Dit is een recombinant eiwit dat is afgeleid van de voorloper van het humane bloedstollingseiwit factor IX dat bestaat uit het propeptide wat covalent gebonden zit aan het descarboxy Gla-domein en hierdoor een hoge affiniteit heeft voor carboxylase. De interacties van het propeptide met carboxylase zijn bestudeerd in gezuiverd bovine carboxylase. Het ontbreken van het propeptide en het effect hiervan op de substraateigenschappen van het descarboxy Gla-domein van factor IX, het effect van het propeptide op de carboxylering van een non-Gla-domein sequentie met 5 Glu residuen en de substraateigenschappen van synthetisch d-OC voor het gezuiverde bovine carboxylase worden beschreven in dit hoofdstuk. Uit de resultaten die hierin zijn besproken kunnen een aantal conclusies worden getrokken: (i) de bindingsaffiniteit van het substraat voor het carboxylase en de processiviteit van deze reactie wordt geïnduceerd door het propeptide zonder de noodzaak van geconserveerde Gla-domein sequenties en (ii) factor IX en osteocalcine hebben mogelijk verschillende interactiemechanismen met betrekking tot de carboxylasebinding.

Hoofdstuk 4

Aangezien de resultaten in hoofdstuk 3 zijn verkregen met behulp van gezuiverd carboxylase afkomstig uit bovine lever dat minimaal 2 μM propeptide bevatte, werd er een nieuw protocol voor de zuivering van carboxylase ontwikkeld. Hiervoor hebben we samengewerkt met de groep van Prof. Dr. Stafford (Department of Biology, The University of North Carolina at Chapel Hill, U.S.A.) die de cDNA sequentie van humaan γ -glutamyl carboxylase gecloneerd en tot expressie gebracht hebben in een insecten cellijn, die normaliter geen carboxylase bevat. Het carboxylase dat uit deze cellen werd opgezuiverd was volledig vrij van storend propeptide en/of propeptide bevattende substraten (endogeen substraat). Hierdoor vormt het het gezuiverde recombinante humane carboxylase het systeem bij uitstek om enzym/substraat interacties te meten waarbij de afwezigheid van propeptides gewenst is (bijv. d-OC).

Hoewel de unieke substraateigenschappen van d-OC reeds werden aangehaald in de

hoofdtukken 2 en 3, worden de karakteristieken uitvoeriger besproken in dit hoofdstuk. In hoofdstuk 4 wordt de afwezigheid van remming door het vrije propeptide van factor IX (Pro^{FIX}) op d-OC beschreven terwijl Pro^{FIX} de carboxylering van ProlX-59 Q/S zeer sterk remt. Tevens wordt aangetoond dat d-OC carboxylering niet gestimuleerd wordt door Pro^{FIX} , dit in tegenstelling tot bEELOMe, dat wel wordt gestimuleerd door Pro^{FIX} . Pro^{FIX} verlaagt de K_m van korte penta-peptiden met een factor 10. Het propeptide van osteocalcine (Pro^{OC}) was niet in staat om de carboxylering van zowel ProlX-59 Q/S als d-OC te remmen. Bovendien was Pro^{OC} niet in staat om de carboxylering van bEELOMe te stimuleren of de K_m van bEELOMe te verlagen. Synthetisch gecarboxyleerd osteocalcine (OC) inhibeerde zowel de d-OC als de bEELOMe carboxylering, terwijl het niet in staat bleek de ProlX-59 Q/S carboxylering te remmen. Deze resultaten houden in dat Pro^{OC} niets bijdraagt aan de hoge affiniteit dat het osteocalcine voorlopereiwit heeft voor carboxylase en dat d-OC aan het carboxylase bindt op een plaats die afwijkt van de propeptide bindingsplaats. Uit deze resultaten blijkt echter nog niet of d-OC op het katalytisch domein bindt of op een specifieke osteocalcine bindingsplaats op het carboxylase.

Hoofdstuk 5

In dit hoofdstuk wordt het definitieve bewijs geleverd dat d-OC het carboxylase bindt met een hoge affiniteit op een specifiek osteocalcine bindend domein. Door gebruik te maken van een specifieke katalytisch domein remmer (S-MeTPT) voor carboxylase hebben we aan kunnen tonen dat bEELOMe competitief wordt geremd door S-MeTPT. ProlX-59 Q/S wordt competitief geremd door Pro^{FIX} , aangezien ProlX-59 Q/S allereerst bindt op de propeptide bindingsplaats op carboxylase om vervolgens te worden gecarboxyleerd. Toevoeging van S-MeTPT aan ProlX-59 Q/S carboxylering resulteerde in een non-competitieve inhibitie van ProlX-59 Q/S. Dit is in overeenstemming met het voorgestelde mechanisme volgens welk ProlX-59 Q/S interageert met carboxylase. Aangezien d-OC carboxylering niet werd geremd door zowel Pro^{FIX} als Pro^{OC} werd verondersteld dat d-OC op het katalytisch domein van carboxylase zou binden en dus competitief geremd zou worden door S-MeTPT. Dit bleek echter niet het geval te zijn.

Toevoeging van S-MeTPT aan d-OC carboxylering resulteerde in een non-competitieve remming van d-OC. Omdat d-OC géén propeptide bezit mag de stelling geponeerd worden dat carboxylase naast een propeptide bindingsplaats ook over een specifieke osteocalcine bindingsplaats beschikt waar osteocalcine op een propeptide-onafhankelijke manier kan binden.

Hoofdstuk 6

In dit hoofdstuk beschrijven wij het domein waarmee d-OC met hoge affiniteit bindt aan carboxylase. Dankzij andere Gla-eiwitten is het duidelijk geworden dat voorlopereiwitten over een propeptide beschikken dat zich N-terminaal naast het Gla-domein bevindt. Matrix Gla-proteïne (MGP) beschikt als enige Gla-eiwit over een intern propeptide dat homoloog is aan de bekende propeptides, maar wat niet wordt afgesplitst van het eiwit nadat dit is gecarboxyleerd. In de N-terminus van het d-OC molecuul kan géén homologie worden gevonden met de propeptides van de andere Gla-eiwitten noch met het interne propeptide van MGP. Niettemin veronderstelden we dat de herkenningsequentie voor het carboxylase (CRS) zich bevindt in de N-terminus van d-OC, vóór het Gla-domein tussen residuen 1 en 16. Het Gla-domein van osteocalcine bestaat uit residuen 17-24. Daarom zijn er verschillende d-OC peptiden gesynthetiseerd, te weten d-OC¹⁻²⁵, d-OC³⁻²⁵, d-OC⁵⁻²⁵, d-OC⁷⁻²⁵, d-OC¹⁰⁻²⁵ en d-OC¹³⁻²⁵, die allemaal het niet gecarboxyleerde Gla-domein bevatten zodat ze als substraat zouden kunnen dienen voor de *in vitro* carboxylase test. De kinetische parameters van deze peptiden werden vergeleken met het intacte d-OC molecuul. Als gevolg van de verschillende N-terminale deleties van de peptiden werd duidelijk dat de CRS zich voor het grootste gedeelte bevindt tussen residuen 1 en 13. Sommige aminozuren in dit domein bleken bijzonder belangrijk, aangezien deletie van een aantal residuen resulteerde in een verhoging van de K_m van de peptides. Het verschil in K_m tussen d-OC¹⁻²⁵ en d-OC bedroeg echter nog altijd een factor 10. De carboxyleringsefficiency was het hoogst bij d-OC¹⁻⁴⁹, GST-rhOC¹⁻⁴⁹ en GST-rhOC¹⁻³⁹ in vergelijking tot de korte d-OC peptiden, de propeptid- bevattende substraten of de korte tri- en penta-peptiden. Bovendien bleek een secundaire structurele component

die gelegen is tussen residuen 26 en 39 van het intacte d-OC molecuul ook betrokken te zijn bij de hoge affiniteit van het osteocalcine molecuul voor carboxylase. Dit 26-39 domein bleek in staat om de K_m van d-OC met een factor 10 te verlagen en de carboxylerinsefficiency met een factor 12 te verhogen.

Concluderend zijn de belangrijkste bevindingen in dit proefschrift (I) dat het vitamine K-afhankelijke carboxylase, naast het catalytisch domein, tenminste twee substraat herkenning domeinen bezit. Een herkenning domein is beschikbaar voor "stofactor-type" Gla-eiwitten, het andere domein is essentieel voor "OC-type" substraten. Het eerste domein herkent propeptides, het laatste domein herkent een sequentie aanwezig op d-OC, die nog niet eerder beschreven was.

(II) Nadere analyse van de sequentiesamenstelling toonde aan dat de carboxylase herkenningsequentie op d-OC uit twee gedeelten bestaat. Het eerste gedeelte bestaat uit de residuen 1-13 (N-terminaal van het Gla-domein) en het tweede gedeelte bevindt zich tussen de residuen 26-39 (C-terminaal van het Gla-domein). Het feit dat er een carboxylase herkenningsequentie uit twee delen bestaat die worden gescheiden door het Gla-domein is nieuw.

(III) De efficiency waarmee d-OC werd gecarboxyleerd was het hoogst wanneer vergeleken met propeptide-bevattende substraten en korte penta-peptiden.

(IV) *In vivo* wordt het voorloper molecuul van osteocalcine gesynthetiseerd met een propeptide. Niettemin heeft dit propeptide geen meetbare affiniteit voor carboxylase. Hierdoor blijft de functie van het osteocalcine propeptide onduidelijk. Het is mogelijk dat dit propeptide noodzakelijk is voor een efficiënter gebruik van KH_2 , via een verlaging van de K_m van deze cofactor.

Discussie

Recombinante synthese in *E. coli* van descarboxy osteocalcine al dan niet met een propeptide is moeilijker gebleken dan werd verondersteld. Een enkele verklaring voor het lage expressienivo van osteocalcine dat wij vonden is niet te geven. Een feit is echter dat slechts zéér weinig onderzoeksgroepen in de wereld er in geslaagd zijn

kleine hoeveelheden bacterieel gesynthetiseerd osteocalcine te produceren. Aangezien gedecarboxyleerd bovine osteocalcine (bd-OC) al unieke substraateigenschappen vertoonde in het verleden was één van de redenen om onze onderzoekslijn te starten. Onze experimentele data, afkomstig van organisch gesynthetiseerd decarboxy osteocalcine (d-OC) hebben de al bekende resultaten bevestigd en verder gefundeerd: osteocalcine bezit een aantal unieke substraateigenschappen. Verder gefundeerd aangezien interpretatie van resultaten uit het verleden, verkregen met bd-OC in gewassen microsomen moeilijk was aangezien zowel het substraat als het enzym van bovine oorsprong was, waardoor de eigenschappen zouden kunnen afwijken van de humane eiwitten. Bovendien was het niet mogelijk om beschadigingen aan het bd-OC als gevolg van de thermische decarboxylering vast te stellen. In de experimenten beschreven in dit proefschrift hebben we gebruik gemaakt van gezuiverd humaan recombinant carboxylase (hoofdstukken 4, 5 en 6). Dit carboxylase is vrij van contaminerende en belemmerende propeptides of endogene substraten wat onze experimentele resultaten verder versterkt. De resultaten in dit proefschrift hebben nieuwe inzichten verschaft in de wijze waarop Gla-eiwitten in staat zijn aan carboxylase te binden. Wat voorheen onbekend was, is dat carboxylase over tenminste twee hoog-affiniteits bindingsplaatsen voor Gla-voorlopereiwitten beschikt. Of deze twee bindingsplaatsen de enigen zijn op carboxylase is nog onbekend, maar dit kan aanzienlijke consequenties hebben voor de optimale synthese van bijvoorbeeld recombinante Gla-eiwitten in eukaryote cellen, noodzakelijk voor de behandeling van hemofiliepatiënten. Echter, een gedegen begrip van de structuur en de interacties van de Gla-eiwitten met het carboxylase zijn noodzakelijk om maximale en efficiënte synthese en carboxyleringsgraad te verkrijgen.

De recente ontdekking van nieuwe Gla-eiwitten waaronder het carboxylase zelf, of Gla-eiwitten die zijn betrokken celgroei (Gas-6) of bij nog onbekende processen (PRGP-1 en PRGP-2) geeft aan dat de ontdekking van nieuwe Gla-eiwitten niet uit te sluiten is ^{1,2}. De wijze van interactie tussen deze nog te ontdekken Gla-eiwitten en het carboxylase zou, net als osteocalcine, kunnen plaatsvinden op een propeptide onafhankelijke wijze. Dit kan worden geïllustreerd met het volgende hypothetische

rekenvoorbeeld; Men vermoedt dat het menselijke genoom uit circa 100.000 genen bestaat. Hiervan is 30 % inmiddels bekend, wat overeenkomt met 30.000 verschillende eiwitten. Indien de nu 13 bekende Gla-eiwitten 30 % vertegenwoordigen van het totale aantal Gla-eiwitten houdt dit in dat er nog 26 Gla-eiwitten kunnen worden ontdekt. Van deze 26 Gla-eiwitten zullen ten minste 2 eiwitten het carboxylase binden zonder de noodzaak van een propeptide. Dit houdt in dat carboxylase een veelzijdig enzym is dat in staat is om verschillende typen eiwitten te binden.

De rol van Gla als Ca^{2+} (of andere divalente metaal-ionen) bindend aminozuur blijft discutabel. Er bestaan veel eiwitten die zeer goed in staat zijn om Ca^{2+} te binden zonder de noodzaak van Gla-residuen. Osteonectine, een non-Gla basaal membraaneiwit afkomstig uit bot en bloedplaatjes bevat een glutaminezuurrijk Ca^{2+} bindend domein. Gas-6 bijvoorbeeld, fungeert als een ligand voor verscheidene proteïne kinasen die betrokken zijn bij cellulaire groeiregulatie. Een deletiemutant van Gas-6, waarvan het volledige Gla-domein ontbreekt, is zeer goed in staat om aan de extracellulaire domeinen van twee celadhesie-molecuul gerelateerde tyrosine kinase receptoren Rse en Axl te binden en zo de fosforylering te activeren ³ Hierdoor blijft onduidelijk wat de functie van de Gla-residuen in Gas-6 of andere (nog onbekende) Gla-eiwitten is. Het vitamine K-afhankelijke carboxylase zelf is eveneens een Gla-eiwit, met 3 Gla-residuen ⁴. De functie en de positie van deze Gla-residuen in het carboxylase molecuul zijn nog niet bekend. Bovendien is het nog niet bekend of carboxylase wel in staat is te functioneren zonder Gla-residuen. Gla residuen zijn ook al in 1982 ontdekt in hermatypische koralen, maar de herkomst van dit Gla bleef onbekend ⁵. Er zijn tevens Gla-eiwitten ontdekt in de gifklieren van de roof-zeeslak *Conus geographus* ⁶. Dit was het eerste en voorlopig enige ongewervelde organisme waarvan bekend werd dat het posttranslationeel carboxyleerde. Tot dan toe werd aangenomen dat carboxylering uitsluitend was voorbehouden aan gespecialiseerde zoogdiersystemen. Het *Conus* Gla-eiwit, conantokine-G genaamd, is een peptide met een lengte van 17 aminozuren met daarin 5 Gla-residuen. Het conantokine-G remt de N-methyl-D-aspartaat receptor, waardoor vissen worden verlamd en zo een gemakkelijke prooi vormen voor de op vis jagende zeeslak. Naast conantokine-G zijn er tenminste 2

andere Gla-residu bevattende conantokines bekend, namelijk conantokine-T en conantokine-R^{7,8}. De voorlopereiwitten van de conantokines bezitten eveneens een propeptide dat met grote affiniteit bindt aan het *Conus*carboxylase, maar niet aan zoogdiercarboxylase. Dit houdt in dat er verschillen bestaan in het enzym of het *Conus* propeptide versus de zoogdierpropeptiden. Of het d-OC in staat is om met hoge affiniteit te binden aan het *Conus*carboxylase dient nog onderzocht te worden, maar zou zeer wel mogelijk kunnen zijn. Dit zou additioneel bewijs kunnen vormen voor de evolutionaire overgang van ongewervelde naar gewervelde dieren en zo een aanvulling kunnen zijn voor de theorieën omtrent de evolutie van de mens.

Het belang van de nieuw ontdekte carboxylase herkenningsequentie is dat het voor substraten de mogelijkheid biedt om carboxylering plaats te laten vinden op een significante afstand van de N-terminus. Normaliter vindt de carboxylering van propeptide-bevattende substraten plaats binnen de eerste 40 N-terminale aminozuren. Dankzij de door Käkönen et al. gesynthetiseerde chimere osteocalcine moleculen is aangetoond dat carboxylering op iedere plaats in een groot eiwit mogelijk is (hoofdstuk 6). Met deze kennis is het wellicht mogelijk om nieuwe leden van deze klasse van Gla-eiwitten op te sporen.

De resultaten welke zijn beschreven in dit proefschrift zullen ertoe bijdragen dat de eigenschappen welke noodzakelijk zijn in het mechanisme van de hoge-affiniteits associatie tussen de verschillende Gla-eiwitten, met name osteocalcine, en het vitamine K-afhankelijke γ -glutamyl carboxylase beter begrepen worden.

Referenties

1. Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G. & Schneider, C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* **13**, 4976-4985 (1993).
2. Kulman, J. D., Harris, J. E., Haldeman, B. A. & Davie, E. W. Primary structure and tissue distribution of two novel proline rich gamma carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9058-9062 (1997).
3. Mark, M. R., Chen, J., Hammonds, R. G., Sadick, M. & Godowsk, P. J. Characterization of Gas6, a member of the superfamily of G domain- containing proteins, as a ligand for Rse and Axl. *J Biol Chem* **271**, 9785-9789 (1996).
4. Berkner, K. L. & Pudota, B. N. Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proc Natl Acad Sci*

USA 95, 466-471 (1998).

5. Hamilton, S. E. *et al.* gamma-Carboxyglutamic acid in invertebrates: its identification in hermatypic corals. *Biochem Biophys Res Commun* **108**, 610-613 (1982).
6. McIntosh, J. M., Olivera, B. M., Cruz, L. J. & Gray, W. R. Gamma-carboxyglutamate in a neuroactive toxin. *J Biol Chem* **259**, 14343-14346 (1984).
7. Haack, J. A. *et al.* Conantokin-T. A gamma-carboxyglutamate containing peptide with N-methyl- d-aspartate antagonist activity. *J Biol Chem* **265**, 6025-6029 (1990).
8. White, H. S. *et al.* Conantokin-R. *Soc Neurosci Abstr* **23**, 2164 (1997).